



線維芽細胞増殖因子を担持した水酸アパタイトの創製

著者	佐々木 健吉
号	8
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	環博第54号
URL	http://hdl.handle.net/10097/59046

さ さ き けん きち

氏 名 佐々木 健 吉

授 与 学 位 博士 (環境科学)

学 位 記 番 号 環博第54号

学 位 授 与 年 月 日 平成23年3月25日

学位授与の根拠法規 学位規則第4条第1項

研究科, 専攻の名称 東北大学大学院環境科学研究科 (博士課程) 環境科学専攻

学 位 論 文 題 目 線維芽細胞増殖因子を担持した水酸アパタイトの創製

指 導 教 員 東北大学教授 井奥 洪二

論 文 審 査 委 員 主査 東北大学教授 井奥 洪二 東北大学教授 石田 秀輝
東北大学教授 井上 千弘

論 文 内 容 要 旨

【第1章】諸言

本研究の目的は、生体が本来備えている損傷の修復機能や、体外の細菌に対する防衛機能を活性化させることによる、治療効果を高めるための医用材料の創製である。このような材料が創製されれば、治療効果が高くしかも環境に対して低負荷な医療が可能となる。これを実現するための材料として、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を担持した水酸アパタイト (HAp) に着目した。HAp は、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の化学式であらわされるリン酸カルシウム化合物である。HAp は生体親和性に優れ、様々なタンパク質を吸着する性質を示す。また、生体内のイオン環境中では pH5.2 以下で溶解する性質を示すことから、作用させる部位によって薬剤徐放性能を制御した材料設計が可能であると考えた。FGF-2 は中胚葉系 (骨、血管、皮膚真皮など) と外胚葉由来の神経細胞に対して作用し、増殖を促進するタンパク質である。すでに医療の現場で用いられている FGF-2 および HAp を用いて新規材料の開発を試みることで、短期間の実用化が可能と考えられる。

FGF-2 を HAp に担持させるデザインとして、FGF-2 を HAp に吸着させるモデル (図 1-a) と、FGF-2 が HAp に取り込ませたモデル (図 1-b) を想定した。前者のモデルは、FGF-2 を HAp に吸着させ、骨折部位など、pH が酸性に傾いている部位に作用させることで、短期間での FGF-2 の脱離と徐放を期待した。後者のモデルは、FGF-2 を HAp に均一に取り込ませ、pH が中性の部位に作用させること

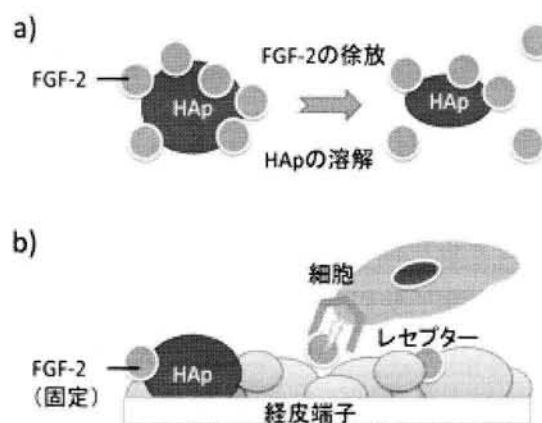


図 1: FGF-2 担持 HAp の設計と作用
a) FGF-2 を HAp 顆粒に吸着
b) FGF-2 を HAp 層に取り込ませる

で、より長期間 FGF-2 が効果を発揮し続けることを期待した。

【第2章】骨治療への応用を目指した FGF-2 徐放性 HAp 顆粒の創製

骨折時の治癒促進を目指した材料の作製を目的として、FGF-2 を吸着させた HAp 顆粒を作製した。この FGF-2 を吸着した HAp 顆粒では、骨折治癒初期の骨芽細胞の増殖期に急速な FGF-2 の徐放が期待できる。

試料作製は次の手順で行った。リン酸カルシウム過飽和溶液を出発溶液として、この溶液を 120℃ で 1 時間水熱処理することにより HAp 顆粒を作製した (図 2)。作製した顆粒のタンパク質吸着特性を評価するために、FGF-2 のモデル物質として FGF-2 と分子量、等電点が近いチトクローム c (Cyt-c) を用いた。HAp 顆粒の Cyt-c 吸着能力を調べたところ、吸着能力は顆粒重量の約 1 mass% であった。そして HAp 顆粒に吸着させた Cyt-c の徐放特性を調査したところ、組織再生に必要な FGF-2 量の指標²⁾とした 1μg 以上の Cyt-c の徐放が 4-7 日の徐放期間終了まで持続した。

骨が修復する過程では、骨芽細胞の働きで骨の再生が進行する。FGF-2 を吸着させた HAp 顆粒から徐放された FGF-2 を骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) に対して作用させたところ、細胞群の細胞数は、コントロールとした HAp 顆粒と比較して増加傾向が見られた (図 3)。細胞数の単純な比較ではこの傾向は 15-18 日の培養期間終了まで続き、少なくとも 15 日間は骨芽細胞増殖活性を有した FGF-2 が存在し細胞に作用し続けたといえる。過去の知見において、骨再生が認められた材料についても、2 週間かけて FGF-2 の担持量の 97% が徐放している³⁾。このことから FGF-2 を担持した HAp 顆粒は骨修復を加速させる材料として効果が期待できると結論付けた。

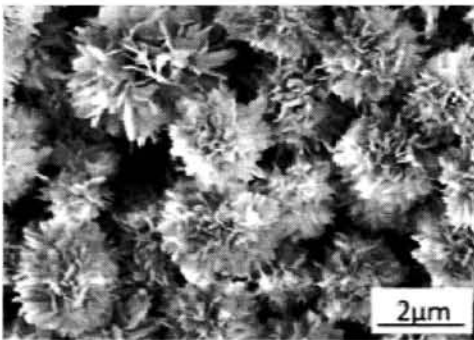


図 2: 過飽和溶液を水熱処理することで作製した顆粒の SEM 像

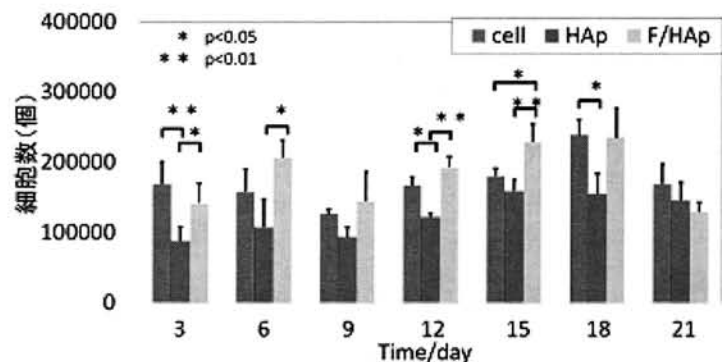


図 3: 培養後の細胞数の推移 (初期細胞数 10000 個)
Cell: 細胞のみを培養 HAp: HAp 顆粒と共存させ培養 F/HAp: FGF-2 を担持した HAp 顆粒と共存させ培養

【第3章】経皮端子への応用を目指した FGF-2 徐放性 HAp 層のコーティングデバイスの創製

経皮端子使用時の細菌感染を抑制するための材料作製を目的として、エチレンビニルアルコール (EVOH) 上に、FGF-2 を分散保持した HAp を成膜した。FGF-2 を HAp 中に分散させた膜については、長期間にわたる FGF-2 の作用が期待でき、血管新生や皮膚組織の再生効果によって経皮端子を経由する細菌感染を抑制できると考えた。

試料作製は次の手順で行った。FGF-2 を含むリン酸カルシウム過飽和溶液に EVOH を 25℃24 時間の条件で浸漬して、FGF-2 担持 HAp を EVOH 上に成膜した。10 $\mu\text{g/mL}$ 以下の FGF-2 濃度の溶液を用いた場合に FGF-2 担持 HAp を成膜することが可能であり、FGF-2 担持 HAp の成膜に成功した基板には、網目状の構造が析出していた (図 4)。この基板上に成膜した FGF-2 担持 HAp には約 1.5~1.6 $\mu\text{g/cm}^2$ の FGF-2 と最大約 80 $\mu\text{g/cm}^2$ のリン酸カルシウムが含まれていた。

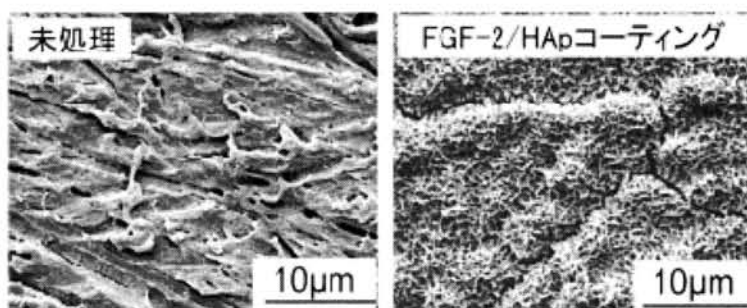


図 4: FGF-2 担持 HAp を成膜した EVOH の SEM 像

【第 4 章】経皮端子上に作製した FGF-2 担持 HAp の生物学的評価

EVOH 上に成膜した FGF-2 担持 HAp の動物への埋入試験による細菌感染防止効果を評価した。FGF-2 担持 HAp を成膜した EVOH 基板をラットの頭部の皮膚中に埋入して経過を観察した。EVOH 単体を埋入した場合に比べて、細菌感染の指標として設定したダウングロウスの長さ (図 5)、線維性結合組織の厚さは共に減少したが、HAp のみを成膜した場合と比べて顕著な差異は認められなかった。

生体外における細胞増殖試験により、膜表面に担持されている FGF-2 の細胞に対する増殖活性の有無を調べた。EVOH 上に成膜した FGF-2 担持 HAp を線維芽細胞様細胞 (NIH3T3-3-4) と共存させて培養すると、NIH3T3-3-4 に顕著な増殖促進効果が表れ、担持した FGF-2 には活性が残存していた。

FGF-2 担持 HAp を作製した時点で、活性を保持した FGF-2 がどの程度残存しているかを検討した。その結果、FGF-2 担持 HAp を作製した時点で、活性を十分に保持した FGF-2 量は数 ng 以下まで減少していた。また、複合膜を 3 日間培地に浸漬した場合には、活性を保った FGF-2 が数十 pg しか徐放されなかった。

MALDI-TOF による分子量測定を用いて、FGF-2 の失活が、FGF-2 の主鎖の切断を伴い分子量が大きく変化するほど過酷なものであったのかを調査した (図 6)。それぞれ分子量 17100 の FGF-2 に起因するピークとその 2 価イオンのピークが認められ、担持過程のリン酸カルシウム溶液中での FGF-2 の失活は一次構造の切断を伴うほど過酷な

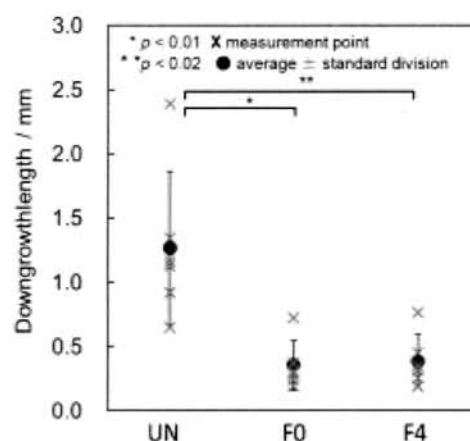


図 5: ラットの頭部に試料を埋入した場合のダウングロウス長
UN: 未処理 F0: HAp を成膜
F4: FGF 担持 HAp を成膜

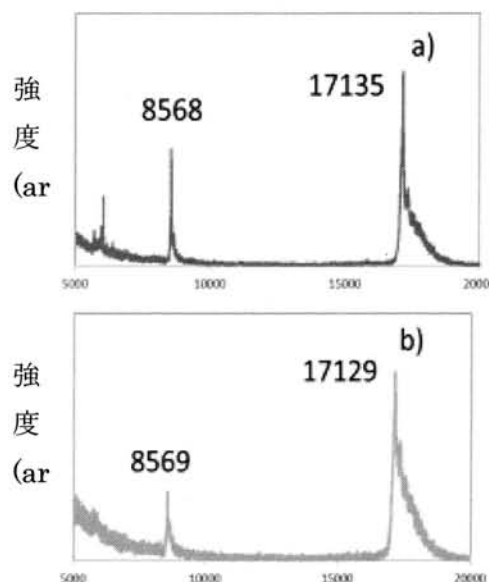


図 6: MALDI-TOF による分子量測定
a) 未失活の FGF-2
b) 失活した FGF-2 (残存率 4.4%)

条件での失活ではなかったことから、担持手法の改良により FGF-2 の失活量を低減し、活性を保った FGF-2 量の向上する形で、より積極的に細菌感染を防止する FGF-2 担持 HAp 材料を作製する可能性がある。

【第 5 章】総括

各章の内容を要約し、FGF-2 を担持した HAp のデザインについて考察した。現在の区分では、感染性廃棄物の評価は形状、発生場所、感染症の種類の順の優先順位で判定することになっており、この評価方法では例えば、医療機関から排出される血液付着物はすべて感染性という位置づけとなる。新規医療材料の開発により、治療効果を高め、治療期間の短縮を図ることができれば、薬剤使用の低減により環境中への薬剤放出量を削減し、さらに感染性廃棄物の排出量を削減しうる。このことから環境低負荷と治療効果の向上とを両立を図る医療用材料として FGF-2 担持 HAp は有効であると考えられる。以上のように本研究の目標とした環境低負荷と治療効果の向上とを両立を図る医療用材料として FGF-2 担持 HAp は有効であると考えられる。医療か、環境か、という 2 択ではなく、両立可能な材料を創製できることを示すことができた一例と考える。

- 1) K. Ioku, *J. Ceram. Soc. Japan* (2010) vol.118 775-783
- 2) M. Tanihara et al., *J. Biomed. Mater. Res.* (2001) 56 216-221
- 3) H. Kawaguchi et al., *J. Orthop. Res.* (2007) 25 480-487

論文審査結果の要旨

本論文は、優れた治療効果と環境低負荷を両立する医用材料の創製を目指し、新規材料の作製と評価を行ったものである。本論文は、全5章より構成されている。

第1章“諸言”では、生体に備わる損傷の修復機能や体外の細菌に対する防衛機能を活性化させることによって、治療効果の向上を期待できる医用材料の創製について述べた。

第2章“骨治療への応用を目指した FGF-2 徐放性 HAp 顆粒の創製”では、骨折時の治癒促進を目指した材料の作製を目的として、種々の細胞の増殖や分化を進行させる効果のある塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を吸着させた水酸アパタイト (HAp) 顆粒を作製した。この顆粒は、水熱条件下での新規な溶液プロセスによって作製したものであり、吸着させた FGF-2 をこの材料の使用初期段階で急速に徐放させることができると考えられる。また、FGF-2 のモデル物質としてチトクローム c (Cyt-c) を用いて検討したところ、4〜7 日の期間でも徐放が継続することが確認された。FGF-2 を担持した HAp 顆粒は、骨修復を加速させる材料として長期的な効果が期待できる。

第3章“経皮端子への応用を目指した FGF-2 徐放性 HAp 層のコーティングデバイスの創製”では、経皮端子使用時の細菌感染を抑制するための材料作製を目的として、高分子素材であるエチレンビニルアルコール (EVOH) 上に、FGF-2 を分散保持させた HAp を溶液プロセスによって成膜した。FGF-2 を HAp 中に分散させた膜については、長期間にわたる FGF-2 の作用が期待できる。FGF-2 は、均一に HAp 中に担持されている可能性が高く、高い治療効果が期待できる。

第4章“経皮端子上に作製した FGF-2 担持 HAp 層の生物学的評価”では、EVOH 上に成膜した FGF-2 担持 HAp の動物への埋入試験による細菌感染防止効果の評価、生体外における細胞増殖促進効果の評価を行った。動物実験の結果を受けて膜表面に担持されている FGF-2 のうち立体構造を保ち、生理活性を失っていないと考えられるものを定量したところ、生理活性を保持した FGF-2 量は数 ng レベル以下まで減少していることが明らかになった。しかしながら、生体外で線維芽細胞様細胞 (NIH3T3-3-4) をこの材料と共存させ培養すると、顕著な細胞増殖促進効果が表れた。生体内環境では、血流により薬剤が拡散していくことを考慮し、FGF-2 の担持量を適正に見積もることが重要であると考えられる。

第5章“総括”では、各章の内容を要約し、FGF-2 を担持した HAp のデザインについて考察した。さらに、得られた知見を基にして、本研究の目標とした「環境との調和と高い治療効果を両立する医用材料」について総合的に考察した。

以上のように、本論文は、優れた治療効果と環境低負荷を両立する医用材料の創製を目指し、新規な材料のデザインを提案したものである。その研究内容は、工学・医学・薬学という多方面から学際的にアプローチしたものであり、今後の環境科学および医工学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文を博士(環境科学)の学位論文として合格と認める。